

学校编码: 10384

分类号: _____ 密级: _____

学 号: B200326012

UDC: _____

学 位 论 文

中国部分地区戊型肝炎流行病学研究及戊型肝炎病毒宿主选择差异的结构基础初探

葛胜祥

指 导 教 师: 夏宁邵 教授

苏文金 教授

厦门大学生命科学学院生物医学系

申请学位级别: 博 士 专业名称: 微生物学

论文提交日期: 2006 年 10 月 30 日 论文答辩日期: 2006 年 12 月 16 日

学位授予单位和日期: 厦 门 大 学

答辩委员会主席: 朱关福 教授

评阅人: 朱关福 教授

田德英 教授

戚中田 教授

曹务春 教授

姜庆五 教授

2006 年 10 月 30 日



博 士 学 位 论 文

Doctor Dissertation

中国部分地区戊型肝炎流行病学研究及戊型肝炎病毒宿主选择差异的结构基础初探

**Epidemiology of Hepatitis E in Selected Regions of China and
Priliminary Charaterizatton and Its Structural Bases for the
Differentiation of Host Ranges among Hepatitis E Viruses**

葛胜祥

Ge Shengxiang

指 导 教 师: 夏宁邵 教授 苏文金 教授

Thesis Supervisor: Professor Xia Ningshao, Professor Su Wenjin



2006 年 10 月 30 日

厦门大学原创性说明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除了文中已注明引用的内容外，本论文不含任何其它个体或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式表明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：

日期： 年 月 日

中国部分地区戊型肝炎流行病学研究及戊型肝炎病毒宿主差异的结构基础初探

摘 要

戊型肝炎病毒（HEV）是戊型肝炎（戊肝）的病原体，随着戊型肝炎研究的深入及诊断试剂的发展，人们对戊肝的传统认识不断被突破。戊肝作为一种人畜共患病已为人们所公认，HEV 输血传播已得到了证实。依托更可靠的检测技术，对我国戊肝流行情况的全面重新了解十分必要。

已报道的 HEV 核酸检测 PCR 引物的灵敏度存在一定缺陷，为此，我们首先根据我国流行的 HEV 序列特征重新设计了一套引物。检测结果证明，该套引物具有较好的检出率和分析灵敏度。

对多个地区 HEV 的分子流行病学研究发现，猪源 HEV 均为基因 4 型，而健康人群中检出的 HEV 基因 1、4 型比例大致相当，但临床散发性戊肝患者绝大部分为基因 4 型 HEV 感染。分离于人和猪的基因 4 型 HEV 高度同源，表明人、猪基因 4 型 HEV 在自然界中可自由传播而不受种属限制。基因 4 型 HEV 的变异程度明显大于基因 1 型，并表现出一定的地域集中特点。

利用新一代 HEV 诊断试剂在 3 省 12 个县市的血清流行病学研究表明，HEV 在中国已流行了相当长的时间。各地区 HEV 抗体阳性率（感染率）从 21.2%-62.1% 不等，相邻地区可以有较大差异。在某一地区低烈度的静默流行不会波及到邻近地区。在多数地区，30 岁前男、女感染率没有明显差别，30 岁后男性明显高于女性。HEV 的感染率具有明显的年龄积累现象，但不同地区的增长速度不同，流行程度越高的地区随年龄增长速度越快。9 县市自然人群一年随访结果表明一年内人群感染率均有所上升，不同地区 HEV 的年新感染率不同，从 1.0% 到 15.1% 不等。新感染率 20 岁前要低于 20 岁后，抗体阴转率 10 岁前要高于 10 岁后。临床急性戊型肝炎患者、亚临床感染者和 HEV 既往感染者戊肝 IgG 抗体水平分别为 37.9 U/ml、1.33 U/ml 和 0.56 U/ml。人群戊肝 IgG 抗体总体水平一年间没有明显变化。人群中抗体反弹的个体在反弹前抗体水平最高为 1.6 U/ml，推测人群中

保护 HEV 感染的抗体水平大致为 1.6 U/ml。

在江苏东台、海安、张家港 3 地的一年临床急性肝炎病例观察表明，戊肝四季均有发生，冬春季为发病高峰。戊肝患者平均年龄较其他肝炎患者高，50 岁以上的急性肝炎患者戊肝占 50% 以上。男性戊肝患者明显多于女性，男女比例大致为 5:1，而东台则高达 10:1。40 岁以上人群中戊肝报告发病率为每年万分之一，40 岁男性易感人群中戊肝报告发病率约为每年千分之一，个别地区在 60 岁以上时男性易感人群报告发病率高达每年千分之六，提示在高致病风险人群中使用戊肝疫苗进行免疫保护的重要性。

猪的 HEV 感染在我国非常普遍，平均抗体阳性率达 83.4%，不同地区间没有明显差异。血清流行病学调查表明从事猪相关职业导致 HEV 感染风险升高 (OR=1.74)，而且从事时间越长，风险越高。猪场下游人群与上游相比也有较高的感染风险。提示 HEV 可以通过猪密切接触传播到从业者，并且猪场废水中的戊肝病毒可以通过水流传播。结合猪群比人群高得多的 HEV 带毒率、人源和猪源基因 4 型 HEV 的高度相似及临床戊肝患者主要为基因 4 型感染，推测猪已经成为中国戊肝的重要传染源。

献血员中 HEV 病毒血症者比例大约为 0.1%-0.2%，在某些地区能达 1.6%。这些 HEV 病毒血症者按现有的献血员筛查策略难以排除，因此 HEV 可能是输血后肝炎的潜在原因之一。于北京血站筛查到的一份基因 4 型 HEV 亚临床感染的献血员血浆，经静脉输入恒河猴后，该恒河猴出现粪便排毒和病毒血症，各血清学指标阳转，并出现典型急性肝炎症状，转氨酶升高，肝穿出现典型的肝病变，包括非特异的炎症改变和明显的胆汁郁积。

HEV 的四个基因型根据流行病学和易感宿主的差异可以分为两个大类，一类为只感染人的 H 类 (Human)，包括基因 1 型和 2 型；一类为人畜共患的 Z 类 (Zoonosis)，包括基因 3 型和 4 型。本研究通过比较这两类 HEV 的 ORF2 a.a.368-a.a.606 区段，发现在 HEV 的主要免疫优势表位、中和位点以及受体结合部位 a.a.459-a.a.606 肽段存在 4 个类保守的差异位点，分别为 Ser483Thr、Val492Met、Ser497Thr 和 Ala599Gly。通过定点突变的重组蛋白研究表明 497 位氨基酸的差异导致了这两类 HEV 的免疫优势表位构象的部分改变，而其余三个位点的差异对 HEV 表面结构影响不大。497 位氨基酸的这种差异可能构成了 H

类和 Z 类 HEV 在流行病学上诸多差异的分子机制。

关键词：中国；戊型肝炎；戊型肝炎病毒；流行病学；猪；宿主选择

厦门大学博硕士论文摘要库

Epidemiology of Hepatitis E in Selected Regions of China and Preliminary Characterization and Its Structural Bases for the Differentiation of Host Ranges among Hepatitis E Viruses

Abstract

Hepatitis E virus (HEV) is the pathogen of hepatitis E. With the increasing understanding clinical features of hepatitis E and development of diagnosis assay for HEV, there are continue breakthroughs in our knowledge for this disease. It is accepted that hepatitis E is a zoonotic disease and that HEV can be transfusion-transmitted. As China being a high prevalence region of hepatitis E, it is more important to have reliable diagnostic tools fully understand the epidemic of HEV.

In this study, a set of high sensitive primers was designed on the basis of the presently prevailing HEV in China. The molecular phylogenetic analysis showed, in China, that all swine HEV isolates were of genotype 4, that both genotype 1 and genotype 4 HEV were isolated from subclinical infection in about equal frequency and that the HEV isolated from acute hepatitis patients were almost all of genotype 4. The high degree of nucleotide homology among swine and human genotype 4 HEV isolates is in support that they may be from common infectious sources. Genotype 4 HEV showed more genomic diversity than genotype 1 HEV and geographically more limited distribution.

A cross-section and a follow-up seroepidemiologic study of HEV infection were conducted among residents of 12 rural communities in three provinces (Guangxi, Zhejiang and Jiangsu). The cross-sectional seroepidemiologic study showed that HEV infection is endemic in China for a long time. The levels of infection differ substantially among communities, and a silent outbreak occurring in one of the communities during the time of the study did not spread to neighboring communities.

Seroprevalence was higher for male participants than that for female ones after 30 years of age but was similar for both sexes in the younger age groups. Seroprevalence was found to increase with age at different rate in different community, and it is common that 50% infection rate can be reached at younger age in the community of higher infectious level. Moreover, based on results from the follow-up study, the levels of infection increase with different degrees in all communities, and the positive seroconversion rates differ among communities, ranging from 1.0% to 15.1%. Overall, the positive seroconversion rate is higher among those after the age of 20 than the younger age groups, but the negative seroconversion rate of 0-9 year age group is higher than that of the older age groups. The anti-HEV IgG levels of acute hepatitis E patients, subclinical HEV infection and post HEV infection are 37.9 U/ml, 1.33 U/ml and 0.56 U/ml respectively. The overall anti-HEV IgG level of normal population did not change significantly within one year. During this year, 13 subjects showed above 3 times antibody rise, which are most probably due to subclinical infection. The pre-infection antibody levels of all the subjects ranged up to 1.6 U/ml, and this suggests that higher antibody level might serve to prevent the infection.

The observation of Reported clinical acute hepatitis patients within a year in Dongtai, Hai'an and Zhangjiagong, Jiangsu Province showed that acute hepatitis E mainly occurs in spring, that the average age of acute hepatitis E patients is older than the other acute hepatitis patients and that the amount of male hepatitis E patients is more than those female ones. Acute hepatitis E patients are more than 50% of all acute hepatitis patients after the age of 50. Of acute hepatitis E patients, male to female ratio is about 10:1, furthermore, the M/F ratio reaches 10:1 in Dongtai. The reported incidence of hepatitis E per year is about one in ten thousand people above 40 years of age, and it is about one in thousand male susceptible persons after age of 40. In one community, the reported incidence of hepatitis E in male susceptible people after 60 years of age increases up to six in thousand. All those indicate it important to vaccinate the high pathogenic risk population with hepatitis E vaccine.

Swine infection of HEV is quite common in China with the seroprevalence of 83.4% and no notable difference among different districts. A cross-sectional

seroepidemiologic study was conducted in Deqing to assess the risk of infection attributable to swine farming. Compared with control subjects residing upstream of the swine-farming district, the analysis estimated that the risk of infection was increased by 74% for those engaged in swine farming-related occupations and the risk increased with an increasing duration of occupational swine exposure. The risk of infection was also higher for persons residing downstream of the swine-farming district. These results suggest that the virus might be transmitted to workers in the swine-farming industry by direct contact with swine and that the virus present in effluents from swine farms can spread via waterways to communities downstream. For the higher HEV burden of swine than human, the highly similarity of swine and human genotype 4 HEV and the main genotype 4 HEV infection of acute clinical hepatitis E patients, it may be considered that swine has be a principal reservoir of HEV that infects humans in China.

The rate of HEV viraemia in blood-donors is about 0.1%-0.2%, but in Shaoxing, up to 1.6%. Those blood-donors cannot be excluded by present blood screening methods, so HEV in donated blood maybe be a potential reason for transfusion-transferred hepatitis. Furthermore, a Rhesus monkey was transfused intravenously with 10 ml of plasma from a blood-donor with genotype 4 HEV viraemia. Hepatitis was associated with an elevated ALT level, which was preceded by virus excretion/viraemia and followed by HEV seroconversion. Liver biopsy showed characteristic liver pathology, including non-specific inflammatory changes and prominent canaliculi stasis.

Based on their difference of susceptible host and epidemic character, the four genotype of HEV can be divided into two classes. One, class H, including genotype 1 and genotype 2, only infects human. The other, class Z, including genotype 3 and genotype 4, is zoonosis. Comparing ORF2 a.a.368-a.a.606 of those two class HEV, this study found 4 conservative different sites between the two class HEV in ORF2 a.a.459-a.a.606 (the primary immuno-dominant epitope, the neutralizing site and the receptor-binding site of HEV), including Ser483Thr, Val492Met, Ser497Thr and Ala599Gly. Study on recombinant proteins produced by site-directed mutation showed that the difference on a.a.497 induces part conformational change of their

immuno-dominant epitope between the two class HEV and that the mutation on the other 3 sites don't disturb surface structure of HEV. The difference on a.a.497 is the possible molecular basis of different epidemic character between class H HEV and class Z HEV.

【Key words】 China, Hepatitis E, Hepatitis E Virus, Epidemiology, Swine, Differentiation of Host Ranges

中文摘要	I
英文摘要 (Abstract)	IV
前 言	1
1. HEV的生物学特性	2
1.1. HEV的形态和理化性质	2
1.2. HEV基因组结构	2
1.3. HEV的分类	5
1.4. HEV的细胞培养模型、动物感染模型	5
2. 戊型肝炎的临床症状、感染进程和免疫应答	8
3. 戊肝的实验室检测	10
3.1. 免疫电镜(IEM)和免疫荧光镜检(IFM)	10
3.2. HEV的分子生物学检测	10
3.3. 检测抗HEV抗体的酶免疫试验(EIAs)	11
4. 戊型肝炎的流行病学	16
4.1. 戊肝流行的特点	16
4.2. HEV的传播	17
4.3. 抗HEV抗体的流行病学概况	18
4.4. 人畜共患	19
5. HEV基因型及其变异性	21
5.1. HEV基因型	21
5.2. HEV基因亚型	22
5.3. HEV地理分布	23
5.4. 人HEV和动物HEV	24
5.5. 基因差异	25
6. 戊型肝炎疫苗的研制	25
6.1. 真核细胞表达的重组蛋白	25
6.2. 原核细胞表达的重组蛋白	26
7. 本论文研究的目的和意义	27

材料与方法	28
1. 材料	28
1.1. 主要仪器	28
1.2. 主要试剂和材料	29
1.3. 常用溶液和培养基的配制	30
2. 方法	32
2.1. 基因克隆	32
2.2. 重组蛋白质的表达, 纯化及鉴定	35
2.3. 样品检测	38
结果与分析	39
第一部分 中国部分地区 HEV 分子流行病学研究	39
1. 基因 1、4 型 HEV 高灵敏度通用引物的设计	39
1.1. 引物设计	39
1.2. 引物分析	40
1.3. 与对照引物的比较	42
2. 部分地区 HEV 的分子流行病学研究	44
2.1. 各标本 HEV RNA 检出情况	44
2.2. 分离 HEV 的同源性分析	45
3. 小结	50
第二部分 中国部分地区 HEV 血清流行病学研究	52
1. 不同地区 HEV 血清流行病学研究	52
1.1. 调查对象一般情况	52
1.2. 人群戊肝感染情况	53
2. 9 县市一年随访	59
3. 临床散发性戊肝病例的流行病学特征	61
4. 人群 anti-HEV IgG 抗体水平定量分析	67
5. 不同地区商品猪中戊肝血清流行病学调查	68
6. 猪在人群 HEV 感染中的作用	71

6.1.	猪群中 HEV RNA 的检出情况	71
6.2.	猪相关职业对人群 HEV 感染的影响	74
7.	小结	75
第三部分 HEV 输血感染危险性的初步研究		76
1.	HEV 经输血传播感染恒河猴	76
2.	献血员中 HEV 感染情况	77
3.	小结	78
第四部分 H 类与 Z 类 HEV 的分子差异性研究		80
1.	序列对比分析 H、Z 类 HEV 在 ORF2 a.a.368-a.a.606 的保守性类差别位点	81
1.1.	序列获取并分型	81
1.2.	分析各型间有差别的保守位点并获得类相关的保守差异位点	82
2.	类相关保守差异位点的定点突变	83
3.	突变体与单抗的免疫反应性分析	85
3.1.	用来分析 ORF2 a.a.368-a.a.606 类保守差异的单抗	85
3.2.	p239、D66 及 p239 的系列突变体与各单抗的反应活性	86
4.	小结	91
讨 论		92
1.	E 引物的评价	92
2.	Anti-HEV 抗体检测试剂	93
3.	HEV 不同基因型在国内的流行情况	96
4.	猪作为 HEV 基因 4 型的自然宿主对国内 HEV 流行的影响	97
4.1.	猪是目前中国临床戊型肝炎的重要传染源	97
4.2.	基因 4 型的变异	98
5.	影响 HEV 感染的因素	99
6.	临床急性戊型肝炎的主要特征	100
7.	人群戊肝抗体水平	100
8.	HEV 输血感染的危险性	101
9.	HEV 免疫预防的必要性	102

10.	H类和Z类HEV在ORF2 497位氨基酸差异的可能生物学意义·····	103
	结论与展望·····	105
	参考文献·····	107
	在校期间发表论文·····	128
	致 谢·····	132

前言

戊型肝炎病毒（HEV）是一种小的无包膜正二十面体的单链正义RNA病毒，引发戊型急性病毒性肝炎。戊型肝炎临床症状与甲型肝炎类似。

早在20世纪50年代，在南亚地区就暴发过因水源污染而致的急性肝炎的流行。由于当时缺乏特异性的病原学诊断方法，其病因一直不明确。直到80年代初建立了甲型肝炎和乙型肝炎的特异性诊断方法后，对该次流行进行回顾性调查发现，患者血清内缺乏甲型肝炎病毒感染的指标，表明有另一种能引起流行性肝炎的病原存在^[1, 2]。1983年前苏联学者Balayan等^[3]应用免疫电镜技术首先在一位志愿感染者的粪便中发现了病毒样颗粒。1988年将本病命名为戊型肝炎，相应的病原被命名为戊型肝炎病毒。

戊肝流行于许多热带亚热带地区的发展中国家（图1）。我国、印度、缅甸、尼泊尔、阿富汗、巴基斯坦、印度尼西亚、泰国、黎巴嫩、前苏联中亚各国、阿尔及利亚、突尼斯、埃塞俄比亚、苏丹、索马里、乍得、象牙海岸以及中美洲的墨西哥等地均发生过暴发流行^[2, 4-8]。



图1 戊型肝炎的地理分布^[9]

Fig 1 The geographic distribution of hepatitis E^[9]

HEV主要经消化道传播，有两种流行模式：一种是由粪便污染水源引起的大规模暴发流行，主要发生在不发达国家和地区；另一种是由于个人及公共卫生不良导致的散发流行，在全世界范围内广泛存在。

最近的研究发现在全球范围内的多种野生或家养的本土动物中含有抗HEV抗体^[10]，并提供了戊肝高发区和非流行地多种动物天然感染HEV的分子生物学证据^[11-17]，提示HEV可能是一种人畜共患病。此外，在美国、台湾、希腊、意大利、西班牙、德国、英国、法国、加拿大、澳大利亚、匈牙利、奥地利、韩国、日本和阿根廷等传统意义上的非流行地分离到了与戊肝疫区原型株不同的新型HEV分离株^[13, 14, 18-25]。因此，HEV的分布可能要比原先想象的更广泛。

1990年HEV的基因组克隆成功后^[26]，HEV的酶联免疫吸附试验（ELISA）试剂研制成功^[27]。但近年来研究发现，原有试剂的检测灵敏度存在较大缺陷^[28-39]，因此，有必要利用更可靠的诊断试剂对国内HEV的流行概况重新评估。

1. HEV的生物学特性

1.1. HEV的形态和理化性质

1983年，一口服ET-NANBH患者粪便悬液的志愿者出现了肝炎症状。用此志愿者的含病毒的粪提取物静脉感染猕猴导致肝炎、粪便排毒及抗体反应。HEV形态首次在此志愿者的粪悬液中用免疫电镜(IEM)观察到^[40]。HEV是大小约27~34nm（平均30~32nm）的球形单股正链无包膜的RNA病毒，其表面有许多类似杯状病毒的凸起和缺刻结构，与HAV的平滑表面明显不同。据推测HEV病毒颗粒可能为T=3的二十面体立体对称结构，由60个形态亚单位组成，每个形态亚单位由一个HEV结构蛋白同源二聚体构成。

HEV病毒颗粒在氯化铯中的浮密度为1.35~1.40g/cm³，沉降系数为183S。HEV储存于-70℃与+8℃之间不稳定，液氮中则极为稳定。在酸性和弱碱性环境中较稳定，可存在于肝内胆汁和胆囊内胆汁中

1.2. HEV基因组结构

早期的研究表明ET-NANBH可能是由RNA病毒引起的，因此Reyes和他的同事们试图构建其cDNA文库。他们用二次传代的缅甸株感染猕猴后，获得富含病毒的胆瓢胆汁并以此为原料在γgt10中构建出一个cDNA文库，尔后从其中筛选出一个命名为ET1.1、含有一段1.3kb的非人和猴基因的cDNA克隆。对各个地方爆发的ET-NANBH的粪便中提取的cDNA与克隆ET1.1进行杂交分析表明全球ET-NANBH的病原大致相同。此实验和克隆ET1.1的那部分序列于1990年发表

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库